

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-299078

(43)Date of publication of application : 25.11.1997

(51)Int.Cl.

C12N 7/02
C12P 21/00
C12P 21/08
G01N 33/576
G01N 33/577
//(C12P 21/00
C12R 1:92)

(21)Application number : 08-155941

(71)Applicant : NIATSUKU:KK

(22)Date of filing : 14.05.1996

(72)Inventor : OKAMOTO HIROAKI

(54) SEPARATION OF HEPATITIS NON-A, NON-B, NON-C VIRUS PARTICLE, PURIFICATION OF THE VIRUS CORE PARTICLE, AND DETECTION OF THE VIRUS AND CORE ANTIBODY OR THE LIKE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To separate and purify the subject particles and core particles useful as e.g. a hepatitis non-A, non-B, non-C virus antibody/antigen detection system by applying density gradient centrifugation method to hepatitis non-A, non-B, non-C virus-positive human blood as raw material.

SOLUTION: Using hepatitis non-A, non-B, non-C virus-positive human blood as raw material, the serum of the blood is separated and then fractionated using sucrose density gradient centrifugation method to collect a fraction 1.06-1.11g/mL in sucrose density to obtain a fraction containing hepatitis non-A, non-B, non-C virus (GBV-C/HGV). Next, a surfactant is added to the fraction to remove virus envelope therefrom to afford the fraction with reactivity to anti-hepatitis non-A, non-B, non-C virus antibody, thus separating and purifying the objective hepatitis non-A, non-B, non-C virus particles and virus core particles useful as e.g. an antigen for producing anti-hepatitis non-A, non-B, non-C virus antibody necessary for detecting anti-hepatitis non-A, non-B, non-C virus antibody and anti-hepatitis non-A, non-B, non-C virus antigen by labeling.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-299078

(43)公開日 平成9年(1997)11月25日

| (5)IntCl. ⁹ | 識別記号 | 庁内整理番号 | FI | 技術表示箇所 |
|------------------------|------|--------|-------------|--------|
| C12N 7/02 | | | C12N 7/02 | |
| C12P 21/00 | | | C12P 21/00 | B |
| | | 21/08 | 21/08 | |
| G01N 33/576 | | | G01N 33/576 | Z |
| 33/577 | | | 33/577 | B |

審査請求 未請求 請求項の数20 書面 (全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-155941
(22)出願日 平成8年(1996)5月14日

(71)出願人 596075174
有限会社ニアック
東京都杉並区荻窪4丁目28番14-701号
(72)発明者 岡本 宏明
栃木県下都賀郡石橋町石橋1560-25
(74)代理人 弁理士 中島 敏

(54)【発明の名称】 非A非B非C型肝炎ウイルス粒子の分離法、該ウイルスコア粒子の精製法、ならびに該ウイルスおよびコア抗体等の検出法

(57)【要約】

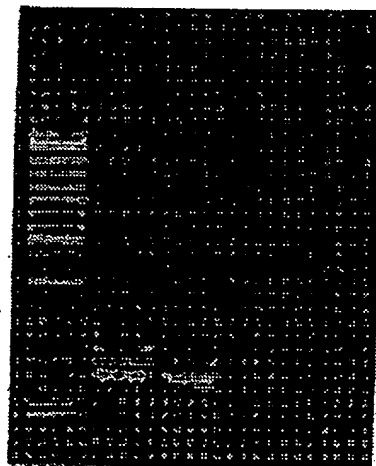
【発明の目的】 非A非B非C型肝炎ウイルスGBV-C/HGVウイルス粒子と同コア粒子を分離・精製し、これによって得た抗原を利用したGBV-C/HGVウイルス抗体・抗原検出系を提供することを目的とする。

【発明の構成】 非A非B非C型肝炎ウイルス陽性ヒト血液を原料とし、密度勾配遠心法により該ウイルス粒子、同コア粒子を分離・精製する。エンベロープ除去には界面活性剤を使用し、また該粒子には標識することが好ましい。該粒子を免疫原として該粒子に対する抗体を得、該抗体を用いて該ウイルス抗原または該コア抗原を検出する。

【発明の効果】 GBV-C/HGV感染の有無を容易に検査することができる。

図面代用写真

1 2 3 4



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】非A非B非C型肝炎ウィルス陽性ヒト血液を原料とし、密度勾配遠心法により分離・精製することを特徴とする非A非B非C型肝炎ウィルス粒子、または該ウィルスコア粒子の分離・精製方法。

【請求項2】しょ糖密度勾配遠心法により、しょ糖密度1.06～1.11g/mlの分画を得る請求項1記載の分離・精製方法。

【請求項3】シュウ化カリウム密度勾配遠心法により分画を得る請求項1記載の分離・精製方法。

【請求項4】塩化セシウム密度勾配遠心法により分画を得る請求項1記載の分離・精製方法。

【請求項5】界面活性剤を用いてウィルスエンベロープを除去する請求項1ないし4記載の分離・精製方法。

【請求項6】目的分画に界面活性剤を加えて抗非A非B非C型肝炎ウィルス抗体への反応性を獲得させる請求項1ないし5記載の非A非B非C型肝炎ウィルスコア粒子精製方法。

【請求項7】請求項1ないし6記載の方法で分離・精製した非A非B非C型肝炎ウィルス粒子または該ウィルス20 コア粒子を標識して、該標識粒子を得る方法。

【請求項8】標識物質として蛍光物質を用いる請求項7記載の製造方法。

【請求項9】標識物質として放射性同位元素を用いる請求項7記載の製造方法。

【請求項10】標識物質としてビオチンを用いる請求項7記載の製造方法。

【請求項11】標識物質として化学発光物質を用いる請求項7記載の製造方法。

【請求項12】請求項1ないし6記載の方法で分離・精製した非A非B非C型肝炎ウィルス粒子または該ウィルス20 コア粒子を免疫原として抗非A非B非C型肝炎ウィルス粒子抗体または抗非A非B非C型肝炎ウィルスコア粒子抗体を得る方法。

【請求項13】抗体がポリクローナル抗体である請求項12記載の製造方法。

【請求項14】抗体がモノクローナル抗体である請求項12記載の製造方法。

【請求項15】請求項12ないし14記載の方法で得た抗非A非B非C型肝炎ウィルス粒子抗体または抗非A非B20 非C型肝炎ウィルスコア粒子抗体を用いて測定試料中の非A非B非C型肝炎ウィルス抗原または非A非B非C型肝炎ウィルスコア抗原を検出する方法。

【請求項16】請求項12ないし14記載の方法で得た抗非A非B非C型肝炎ウィルス粒子抗体または抗非A非B20 非C型肝炎ウィルスコア粒子抗体により非A非B非C型肝炎ウィルス抗原を捕捉し、該抗体と同一または異なる請求項7ないし11記載の標識抗体と反応させる請求項15記載の検出方法。

【請求項17】測定試料を、請求項12ないし14記載 50

の方法で得た抗体を含む反応液と請求項7ないし11記載の標識抗原から選択された標識抗原に加えて競合反応を生じさせることを特徴とする請求項15記載の検出方法。

【請求項18】請求項1ないし11記載の方法で分離・精製した非A非B非C型肝炎ウィルス粒子または該ウィルス20 コア粒子を抗原として、抗非A非B非C型肝炎ウィルス抗体を検出する方法。

【請求項19】請求項14または17記載の抗原検出方法に使用する研究用または診断用キット。

【請求項20】請求項18記載の抗体検出方法に使用する研究用または診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は非A非B非C型肝炎ウィルスならびに非A非B非C型肝炎ウィルスコア抗原を分離・精製する方法と、分離・精製されたこれらウィルス20 粒子ならびに抗原を用いた非A非B非C型肝炎ウィルス抗体、抗原、および該ウィルスコア抗体、抗原の検出法に関する。

【0002】

【従来の技術】ウィルス肝炎の原因ウィルスとしてA型肝炎ウィルス、B型肝炎ウィルス、C型肝炎ウィルス、D型肝炎ウィルス、E型肝炎ウィルス、F型肝炎ウィルスの存在が知られている。これらの肝炎ウィルスのうち血液を介し伝播するものはB型肝炎ウィルス（以下「HBV」という）、HBVをヘルパーとする不完全なウィルスであるD型肝炎ウィルスおよびC型肝炎ウィルス（以下「HCV」という）である。これら肝炎ウィルスは20 輸血後肝炎の原因となり、とくにHCVの感染では成人でも慢性化し高率に肝硬変、肝細胞癌へと進展する危険が知られている。このためわが国では国民医療上重要なウィルスであるとされ、輸血用血液については全例のスクリーニング検査が実施されている。

【0003】しかし、輸血用血液に対するHBV抗体検査およびHCV抗体検査が実施され、汚染血液が除外されたにもかかわらず輸血後肝炎の完全阻止には成功していない。また、急性および慢性肝炎患者の中にウィルス性疾患が疑われるも原因ウィルス进行特定することができない例が見出されたことから、HBVおよびHCV以外の血液伝播性の肝炎ウィルスの存在の可能性が示唆されていた。

【0004】1995年、米国アボット社より非B非C型の血液伝播性肝炎に関係があると考えられるウィルスの遺伝子部分配列が発表され、GBウィルスC（以下「GBV-C」という）と命名された。ほぼ時期を同じくして米国ジーンラプス・テクノロジー社からも同様のウィルス遺伝子が発表されG型肝炎ウィルス（以下「HGV」という）と命名された。その後の遺伝子配列の解明・比較よりGBV-CとHGVは同一のウィルスであ

ると考えられる様になった(以下両者を併せて「GBV-C/HGV」という)。

【0005】公表された遺伝子配列を用いた遺伝子検出法に基づく研究によって、わが国を含め世界の広い範囲がGBV-C/HGVに汚染されていることが判明しつつある。また、GBV-C/HGVが原因と思われる慢性肝炎、肝硬変、肝癌、劇症肝炎例の報告もあり、医療面からもGBV-C/HGV感染の診断は重要であると考えられるようになった。

【0006】現在利用可能なGBV-C/HGVの診断・特定方法はGBV-C/HGV遺伝子を検出する方法である。しかし、この方法は試料取扱上の注意、環境からの汚染を含めた操作上の問題があることから、一般の医療施設・研究施設では容易に利用することができないのが現状である。このような理由から、他の血液伝播性肝炎ウィルスの診断には主に抗体検査あるいは抗原検査が利用されるようになっており、GBV-C/HGVについても抗体検査および抗原検査の開発が望まれている。

【0007】GBV-C/HGVではウィルスそのものの同定がなされないまま遺伝子配列が先行して解明されたので、これまでは遺伝子配列に基づく合成ペプチドならびに組換え体抗原を用いた抗体測定法の開発が先行してきた。このようなしかし、現在までのところHBVやHCVの抗体検出法に匹敵する感度、特異性、正確性を有するGBV-C/HGVの抗体検出系、抗原検出系は未だ完成されていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、GBV-C/HGVウィルス粒子ならびにGBV-C/HGVウィルスコア抗原を分離・精製する方法を確立し、この分離・精製された抗原を利用したGBV-C/HGVウィルス抗体ならびに抗原検出系を提供することである。

【0009】

【問題を解決するための手段】本発明は、非A非B非C型肝炎ウィルスであるGBV-C/HGVウィルス陽性ヒト血液を原料とし、これより非A非B非C型肝炎ウィルス粒子または該ウィルスコア粒子を分離・精製する方法の発明、これらに標識して該標識粒子を得る方法の発明、分離・精製した非A非B非C型肝炎ウィルス粒子または該ウィルスコア粒子を免疫原として、これら抗原に対する抗体を得る方法の発明、これによって得られた抗体を用いて測定試料中の非A非B非C型肝炎ウィルス抗原または非A非B非C型肝炎ウィルスコア抗原を検出する方法の発明、分離・精製した抗原を用いて測定試料中の非A非B非C型肝炎ウィルス抗体または抗非A非B非C型肝炎ウィルスコア抗体を検出する方法の発明、ならびに抗原・抗体検出方法に使用する研究または診断用キットの発明である。

【0010】本発明において、非A非B非C型肝炎ウィルス粒子または該ウィルスコア粒子は、非A非B非C型肝炎ウィルス陽性ヒト血液の血清または血漿を原料とし、密度勾配遠心分離法によって得ることができ、密度勾配遠心分離法としては、しょ糖密度勾配遠心分離法、シュウ化カリウム密度勾配遠心分離法、塩化セシウム密度勾配遠心分離法、あるいは他の分離法を使用することができる。しょ糖密度勾配遠心分離法を使用する場合には、しょ糖密度1.06~1.11g/mlの分画から好適に得ることができる。

【0011】分離・精製される非A非B非C型肝炎ウィルス粒子より該ウィルスコア粒子を得て、これに抗非A非B非C型肝炎ウィルス抗体への反応性を獲得させるためには、目的分画より遊離型γグロブリンを除去したのち、界面活性剤で処理してエンベロープを除去するのが好ましいが、他の処理法を用いてもよい。本発明の検出方法を効率的に行うための一方法としては、分離・精製した非A非B非C型肝炎ウィルス粒子または該ウィルスコア粒子を蛍光物質、放射性同位元素、ビオチン、化学発光物質その他により標識する方法がある。

【0012】本発明は、分離・精製した非A非B非C型肝炎ウィルス粒子または該ウィルスコア粒子を免疫原として、抗非A非B非C型肝炎ウィルス粒子抗体または抗非A非B非C型肝炎ウィルスコア粒子抗体を得る方法の発明であり、抗体としてはモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体が含まれる。これによって得た抗体を用いて測定試料中の非A非B非C型肝炎ウィルス抗原を捕捉し、該抗体と同一または異なる標識抗体と反応させる等の方法により、非A非B非C型肝炎ウィルス抗原または非A非B非C型肝炎ウィルスコア抗原を検出することができる。

【0013】また本発明は、分離・精製した非A非B非C型肝炎ウィルス粒子または該ウィルスコア粒子を抗原として、抗非A非B非C型肝炎ウィルス抗体を検出する方法の発明である。

【0014】本発明においては、測定試料を本発明で得た抗体を含む反応液と標識抗原に加えて競合反応を生ぜしめることにより非A非B非C型肝炎ウィルス抗原または非A非B非C型肝炎ウィルスコア抗体を検出することができる。

【0015】さらに、本発明は、非A非B非C型肝炎ウィルス抗体、抗原、非A非B非C型肝炎ウィルスコア抗体・抗原の検出に使用する研究用または診断用キットの発明である。

【0016】

【作用】本発明の方法によりGBV-C/HGVウィルス粒子等を分離・精製し、またこれらを免疫原として該ウィルス抗原に対する抗体を得ることができる。さらに、この抗体を利用することで該ウィルス抗原を検出することができる。その結果GBV-C/HGV感染の有

無を容易に検出できる。

【0017】

【実施例】以下、本発明の実施例について述べるが、もとより本発明がこれらの実施例に限定されるものではない。

【0018】

【実施例1】本発明者らにより報告されたGBV-C/HGV遺伝子検出法(Yoshida, Okamoto et al., Lancet, 346:1131-1132, 1995)によりGBV-C/HGV陽性と判定されたヒト血漿から次のようにしてGBV-C/HGV RNAに富む分画を得た。GBV-C/HGV RNA陽性血漿200 μ lを本発明者らにより既に報告されている方法(Kojima, Okamoto et al., Virology 204:665-672, 1994)に従い、 γ 糖密度勾配遠心法を用いて分画し、それぞれの分画について密度ならびにGBV-C/HGV RNA量を測定した。即ち、5mlの遠心チューブにそれぞれ10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTAと50mM NaClを加えた55%、45%、35%、25%ならびに15%濃度(重量/容積)の γ 糖液を0.9mlずつ重層した。次に200 μ lの血漿を上層の γ 糖液層に乗せ、さらにその上に10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTAと50mM NaCl液を0.3ml加え、スイングローター(ベックマン社製、SW50.1)で189,400g、10 $^{\circ}$ C、23時間の遠心分離を行った。遠心分離作業終了後、チューブの底に穴をあけ、0.4mlずつ分画を回収した。回収した分画の密度は屈折計を用いて求めた。さらに各分画20 μ lから市販の試薬(ISOGEN-LS、日本ジーン社)を用いてRNAを抽出した。抽出したRNAはジェチルピロカーボネイト処理した蒸留水5.3 μ lに溶解した後70 $^{\circ}$ Cで1分間加熱処理し、すぐに氷冷してから本発明者らにより公表されている方法に従って逆転写を行いcDNAを得た(前出Lancet誌)。このcDNAを95 $^{\circ}$ Cで15分加熱した後2等分し、半分をポリメラーゼチェーンリアクション法(以下「PCR」という)を用い増幅した。増幅産物を所定の方法に従い電気泳動にかけ、GBV-C/HGV遺伝子の有無を確認した。PCRに使用したプライマーは#G8、#G9である(前出Lancet誌)。反応サイクルは変性反応:94 $^{\circ}$ C、30秒、アニーリング反応:55 $^{\circ}$ C、30秒、伸長反応:72 $^{\circ}$ C、60秒からなり、このサイクルを35回繰り返した。最後のサイクルでは伸長反応時間を8分とした。陽性検体では158bpの増幅産物が得られた。その結果、 γ 糖密度1.06-1.11g/mlにGBV-C/HGV RNAが豊富に存在すること(以下GBV-C/HGV RNA-rich fractionという)を確認した。

【0019】表1により、密度1.06-1.11g/mlにGBV-C/HGV RNAが豊富に存在することが分かる。Tween 80(最終濃度5%)処理後はGBV-C/HGV RNA-rich fractionの密度が1.21-1.23g/mlにシフトした。

【0020】

【表1】



【0021】

【実施例2】実施例1で得られたGBV-C/HGV RNA-rich fraction 200 μ lをProtein G Sepharose 4 fast flow(Pharmacia社)500 μ lに加え、遊離型の γ -globulinを除去した。ついで上記分画20 μ lに対し4 μ lのRNase inhibitor(Promega社)およびBSA(最終濃度0.2%)を加え、さらにTween 80を最終濃度5%になるように加え、攪拌後室温にて20分間放置した。この作業によりGBV-C/HGV RNA-rich fractionの密度は1.21-1.22g/mlにシフトすることから、ビリオン(virion)からエンベロープが取り除かれたことが示され、コア粒子が得られたことが分かった(表1右のレーン)。こうして得られたコア粒子分画に被検検体由来のIgG分画を20 μ l加え、室温で1時間反応させた。この被検検体IgG分画は被検検体(血清あるいは血漿)50 μ lにProtein G Sepharose 4 fast flow懸濁液50 μ lを加え、室温で30分間反応させたのち、Protein G Sepharose 4 fast flowに結合した成分を200 μ lの1M酢酸(pH8.0)にて溶出し、1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)1.2mlを加えたものである。この操作により得られたIgG分画についてGBV-C/HGV RNAの有無を実施例1の方法により確認した結果、陽性例由来のIgG分画にもGBV-C/HGV RNA粒子が含まれていないことが確認された。被検検体由来IgG分画と反応させたコア粒子分画にヤギ抗ヒトIgG 20 μ lを加え、室温で30分間反応させた後200 μ lのTEN緩衝液(10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, pH8.0, 50mM NaCl)を加え、15000rpmで15分間遠心分離し、沈査分画を回収した。得られた分画よりRNAを抽出しGBV-C/HGV RNA測定を行い、その存在を確認した(レーン1および2の158bpのバンド)。これに対し、陰性検体と反応させた場合には沈査分画にGBV-C/HGV RNAの存在は認められなかった(3および4のレーン)

このことから上記の方法によりGBV-C陽性ヒト血清と反応性を有するGBV-C/HGVコア粒子が回収されたことが分かった。

【0022】図1は、実施例2で得られたコア粒子とGBV-C/HGV RNA陽性および陰性検体の反応性を示すものである。陽性検体はコア粒子と反応し、回収された沈査にGBV-C/HGV RNAの存在が確認された（レーン1および2の158bpのバンド。）一方、陰性検体と反応させた場合には沈査分画にGBV-C/HGV RNAの存在は認められなかった（3および4のレーン）。

【0023】

【発明の効果】本発明の方法により、GBV-C/HGV*

*Vウィルス粒子および該ウィルスコア抗原を分離・精製することができ、この分離・精製した抗原を利用してGBV-C/HGVウィルス抗体・抗原を検出することができ、GBV-C/HGV感染の有無を容易に検査することができる。

【表1】しょ糖密度勾配遠心法により得られた各密度分画のGBV-C/HGV



RNA測定の結果。

| 密度 (g/ml) | 処理前 | 処理後※ |
|-----------|-----|------|
| 1.01-1.02 | — | — |
| 1.03-1.05 | + | — |
| 1.06-1.08 | +++ | — |
| 1.09-1.11 | +++ | — |
| 1.12-1.16 | ++ | — |
| 1.16-1.21 | + | ++ |
| 1.21-1.23 | + | +++ |
| 1.24-1.25 | — | ++ |
| 1.26-1.27 | — | — |

※ Tween80 (最終濃度5%) 処理後

【図面の簡単な説明】

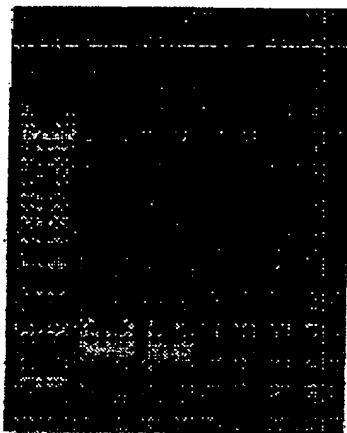
【図1】は実施例2で得られたコア粒子とGBV-C/

30 HGV RNA陽性および陰性検体の反応性。

【図 1】

図面代用写真

1 2 3 4



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶
//(C 1 2 P 21/00
C 1 2 R 1:92)

識別記号 庁内整理番号 F I

技術表示箇所

BEST AVAILABLE COPY

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.